

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Danio rerio, (F. Hamilton, 1822) - modelni
organizam razvojne biologije

Danio rerio, (F. Hamilton, 1822) – model
organism of developmental biology

SEMINARSKI RAD

Zrinka Matić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. STADIJI EMBRIONALNOG RAZVOJA ZEBRICE.....	1
2.1 STADIJ ZIGOTE	2
2.2 STADIJ DIOBA.....	2
2.3 STADIJ BLASTULE	3
2.4 STADIJ GASTRULE.....	4
2.5 STADIJ SEGMENTACIJE.....	5
2.6 STADIJ FARINGULE.....	6
2.7 STADIJ IZLEGANJA.....	7
3. LIČINKA, MLADA I ODRASLA JEDINKA RIBE ZEBRICE.....	7
3.1 LIČINKA RIBE ZEBRICE I MLADA JEDINKA	7
3.2 ODRASLA JEDINKA.....	8
4. PREDNOSTI RIBE ZEBRICE KAO MODELNOG ORGANIZMA.....	9
5. METODE KOJE SE KORISTE U ISTRAŽIVANJIMA	10
5.1 GENETIKA.....	10
5.2 REVERZNA GENETIKA	10
5.3 METODE STANIČNE BIOLOGIJE.....	11
5.4 GENOMIKA	12
6. PRIMJERI ISTRAŽIVANJA S RIBOM ZEBRICOM KAO MODELNIM ORGANIZMOM RAZVOJNE BIOLOGIJE.....	13
7. ZAKLJUČCI	14
8. LITERATURA	15
9. SAŽETAK.....	17
10. SUMMARY	18

1. UVOD

Danio rerio, zebrica, vrsta je slatkovodne, tropske ribe iz porodice Cyprinidae (šarani) (Preuzeto iz <http://www.fishbase.org/search.php>). Pronađena je u plitkim, sporo tekućim vodama na Indijskom potkontinentu. Susrećemo je i u plitkim barama i potocima Nepala, Pakistana i Bangladeša, često povezujući je s uzgojem riže (Preuzeto iz <http://eol.org/>). Na kontinent Sjeverne Amerike dolazi namjernim otpuštanjem ili bijegom iz uzgajališta (Preuzeto iz <https://www.usgs.gov/>). Njezino sadašnje stanište su slatkovodne vode, plitki potoci i rijeke. Zbog svog prirodnog staništa adaptirana je na temperature između 6°C zimi te 38° C ljeti. Najviše jedinki živi na rubnim dijelovima potoka ili u jarcima. Zebrica ime dobiva po pet specifičnih, horizontalnih pruga plave boje, koje izgledom podsjećaju na zebrine pruge. Mužjakovo tijelo oblika je torpeda, sa zlatnim prugama između plavih pruga, dok ženka ima veći, bijeli trbuh sa srebrnim prugama, umjesto zlatnih (Preuzeto iz <http://eol.org/>). *Danio rerio* prosječno naraste do pet centimetara u dužinu te oko dva i pol centimetra u širinu (Nusslein-Volhard i sur., 2002). Prosječni životni vijek zebrice je između dvije i tri godine, iako u idealnim uvjetima mogu živjeti i do četiri godine (Gerhard i sur.,2002). Riba zebrica je svejed, primarno hraneći se zooplanktonom i insektima, iako je analizom izmeta utvrđeno da se hrani i fitoplanktonom, filamentoznim algama, jajašcima beskralježnjaka, sporama... (Watts i sur.,2014). *Danio rerio* desetljećima se koristi kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima. Koristi se u razvojnoj biologiji kralježnjaka te pri istraživanju funkcija gena. Američki molekularni biolog George Streisinger prvi koristi zebricu kao laboratorijsku životinju, uspješno je klonirajući, što je bilo prvo kloniranje jednog kralježnjaka (Li i sur.,2013). Druga područja istraživanja, u kojima riba zebrica pokazuje brojne prednosti kao modelni organizam, su onkologija, neurobiologija, regenerativna medicina, evolucijska biologija, genetika...(Hill i sur.,2005)

2. STADIJI EMBRIONALNOG RAZVOJA ZEBRICE

Stapanje muške i ženske spolne stanice naziva se oplodnja. Taj oblik, s dvostrukim brojem kromosoma, (2n), naziva se zigota. Definirana je nekolicina stadija embrionalnog razvoja ribe zebrice:

1. Stadij zigote (Slika 1.)
2. Stadij dioba (Slika 1.)

3. Stadij blastule (Slika 1.)
4. Stadij gastrule (Slika 1.)
5. Stadij segmentacije
6. Stadij faringule
7. Stadij izleganja

Podjela na ovaj način objašnjava niz razvojnih promjena koje se događaju tijekom prva tri dana nakon oplodnje. Ovakva podjela na stadije, na temelju njihovih morfoloških karakteristika, omogućava točnost u razvojnim studijima, jer se različiti embriji razvijaju različitom brzinom (Kimmel i sur., 1995). Tu asinkronost razvoja uočavamo i kod zebrice. *Danio rerio* embriji, koji su istovremeno oplodeni i uzgajani u istim uvjetima pokazuju asinkronost i to već u najranijim stadijima. Genetička raznolikost djelomično objašnjava ovu pojavu, ali i embriji nastali od zebrica klonova također pokazuju tu pojavu (Streisinger i sur., 1981).

2.1 STADIJ ZIGOTE

Novo oplodeno jajašce nalazi se u stadiju zigote sve do prve diobe, koja se događa oko 40 minuta nakon oplodnje. U tom trenutku promjer zigote je sedam milimetara. Tijekom ovog stadija vidljiva su kretanja citoplazme, nakon već deset minuta. Dio citoplazme bez žumanjka kreće se prema animalnom polu, razdvajajući blastodisk od vegetativnog pola, bogatog žumanjkom. Ta segregacija nastavlja se i dalje kroz razvojne stadije (Kimmel i sur., 1995).

2.2 STADIJ DIOBA

Ovaj stadij opisuje razdoblje od dva do sedam sinkroniziranih i brzih ciklusa staničnih dioba. Nakon prve diobe svaka sljedeća dioba stanica, blastomera, događa se u intervalima od 15 minuta. Dijeljenje je meroblastično, jedino se blastodisk neravnomjerno dijeli. Blastomere ostaju međusobno povezane citoplazmatskim mostom. Prva dioba brazde je vertikalno orijentirana i to je uobičajeno sve do 32-staničnog stadija. Brazda izrasta iz animalnog pola, prolazeći kroz blastodisk, sve do vegetativnog pola, ali ne prolazi kroz žumanjčani dio jaja. Na dnu blastodiska brazda mijenja orijentaciju u horizontalnu, čime

cijepa blastodisk u oblik prvotno opisan od strane Wilsona (1889.). Dioba blastomera je nejednolika i događa se u dvije ravnine, usporedno i okomito u odnosu na os prve diobe. U 16-staničnom stadiju po prvi puta neke blastomere su potpuno odvojene od drugih. Četiri centralne blastomere postaju nepovezane, dok 12 rubnih blastomera i dalje ostaje povezano citoplazmatskim mostom sa žumanjkom. U 32-staničnom stadiju i nadalje diobe središnjih stanica postaju jednolike, dok diobe rubnih stanica i dalje ostaju nejednolike. U 64-staničnom stadiju neke blastomere prvi puta prekriju druge blastomere (Kimmel i sur.,1995).

2.3 STADIJ BLASTULE

Stadijem blastule nazivamo 128-stanični stadij, kada blastodisk počinje poprimati oblik lopte. To je period od osmog do dvanaestog staničnog ciklusa. Sljedeći važni procesi se događaju tijekom ovog stadija :

1. Embrij prolazi kroz proces prijelazne srednje blastule.

2. Stvara se sincicijalni sloj oko žumanjka.

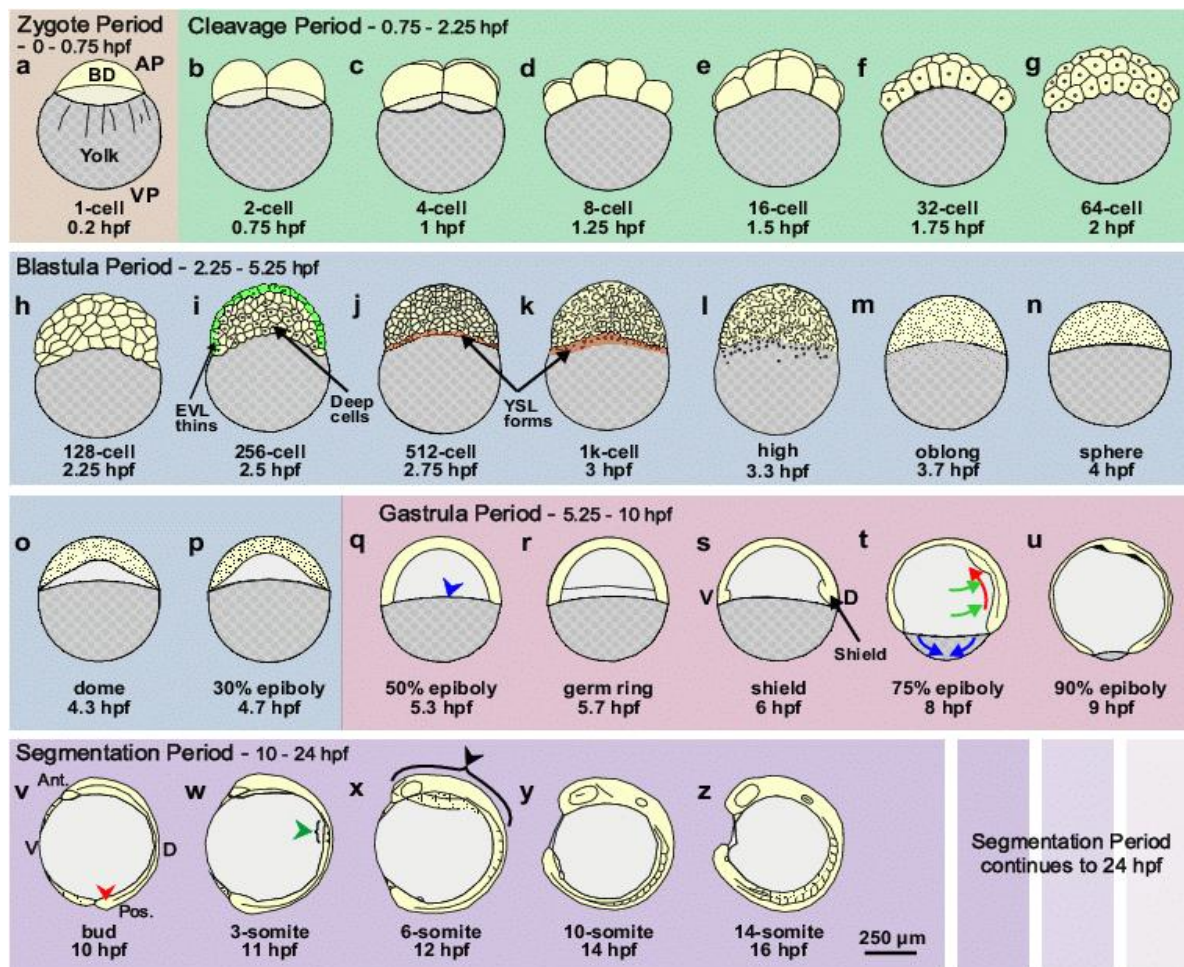
3. Vanjski sloj stanica počinje obrastati unutrašnji sloj stanica, što se naziva epibolija. Epibolija se nastavlja i tijekom gastrulacije.

Tijekom rane blastule diobe se događaju metasinkrono.. Produljenje staničnog ciklusa označava početak prijelazne srednje blastule, što nije sinkrono u svim stanicama. Što je duža interfaza, stanice postaju sve pokretnije. Rubni sloj stanica oko žumanjka tijekom dioba ostaje povezan sa žumanjkom. Ali, u desetom diobenom ciklusu dolazi do kolapsa jezgre i citoplazme tih stanica, stvarajući sincicijalni sloj stanica oko žumanjka. Epibolija započinje u fazi kasne blastule kada se sincicijalni žumanjčani sloj i blastodisk debljaju i šire oko cijelog žumanjka. Tek na kraju gastrule cijeli žumanjak je obuhvaćen. Aktivne, pokretne stanice se prepakiravaju na temelju interkalacija, koje su značajno manje na rubovima u odnosu na središnje stanice. To je možda razlog kasnijeg razvitka mezoderma iz ovih rubnih, neprepakiranih stanica. Istovremeno s interkalacijom i žumanjčane stanice mijenjaju oblik. Razlikujemo nekoliko stadija blastule: 128-stanična, 256-stanična, 512-stanična i 1000-stanična blastula te visoku, duguljastu, sfernu, 30%-tno epiboličnu fazu te fazu kupole. Tijekom visoke faze stanice blastodiska se protežu visoko uz žumanjak. Razlika ove i prijašnjih faza je u izgledu i broju stanica blastodiska i jezgra žumanjčanog sincicijalnog sloja. Tijekom duguljaste faze animalno-vegetativna os blastule se skraćuje, što rezultira guranjem blastodiska blizu žumanjka. Blastula poprima elipsoidni oblik, po kojem je faza dobila ime. U sfernoj fazi nastavlja se skraćivanje pa blastula poprima oblik kugle. Tijekom

zadnje faze, faze kupole površina žumanjčanog sincicijalnog sloja počinje se izbočivati u smjeru animalnog pola, što je pravi dokaz epibolije. Epibolija stvara blastoderm skoro jednolike debljine (Kimmel i sur.,1995).

2.4 STADIJ GASTRULE

Gastrulacija je proces tijekom koje se jednoslojna blastula reorganizira u troslojnu gastrulu. Tijekom gastrulacije epibolija blastodermalnih stanica preko stanica žumanjka se nastavlja, sve dok blastodermalne stanice nisu potpuno obuhvatile stanice žumanjka. To pokretanje omogućuje žumanjčani sincicijalni sloj, koji se širi unutar animalnog pola citoplazme žumanjka. Kako se epibolija događa, stanice iz unutrašnjosti blastoderme popunjavaju prostor između epitelnog sloja stanica i sincicijalnog sloja žumanjka. Potom se stanice iz unutrašnjosti blastoderme i epitelne stanice vraćaju iznad žumanjka, a sincicijalni sloj nastavlja svoju ekspanziju oko žumanjčanih stanica. Tijekom migracije jedan sloj blastoderme postane deblji od ostatka. To zadebljanje naziva se zametni prsten te se sastoji od vanjskog sloja, epiblasta i unutarnjeg sloja, hipoblasta. Smatra se da hipoblast nastaje involucijom superficijalnih stanica. Nakon gastrulacije stanice epiblasta tvore embrionalni ektoderm, a stanice hipoblasta mezoderm i endoderm embrija. Stanice i epiblasta i hipoblasta interkaliraju na budućoj dorzalnoj strani embrija i tvore lokalizirano zadebljanje, embrionalni čvorić. Stanice hipoblasta embrionalnog čvorića šire se anteriorno. Tako se formira prekursor notokorda, kordamezoderm. Stanice susjedne kordamezodermu ili paraksijalnom mezodermu formiraju somite mezoderma. Stanice embrionalnog čvorića formiraju prekordalnu ploču i notokord razvijajućeg embrija. Prekursori ovih regija bitni su za indukciju ektoderma, da postane neuralni ektoderm. BM proteini, morfogenetski proteini kostiju, ventralnih i dorzalnih strana regija induciraju ektoderm da postane epiderma, ali parakrini faktor Chordion, kojeg luči kordamezoderm, blokira te proteine vežući se za njih i omogućuje nastanak neuralne cijevi (Gilbert, 2002).

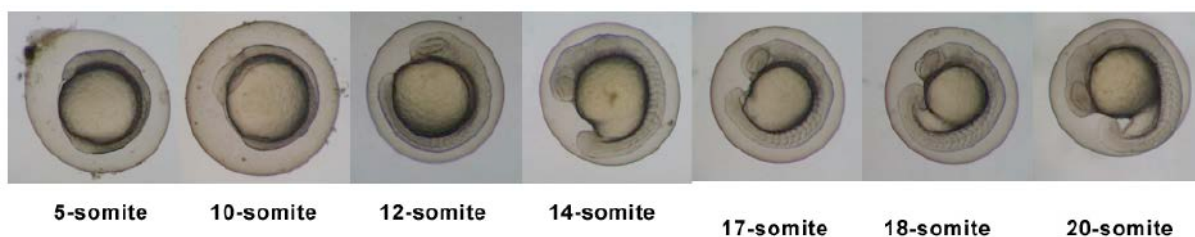


Slika 1. Stadiji embrionalnog razvoja ribe zebrice od zigote do gastrule. Preuzeto iz <http://www.devbio.biology.gatech.edu/>.

2.5 STADIJ SEGMENTACIJE

Stadij segmentacije obilježavaju razvoj somita, rudimente primarnih organa koji postaju vidljivi te izduživanje repa i embrija. Somiti se pojavljuju u trupu i repu. (Slika 2.) Anteriorni somiti razvijaju se prije posteriornih. Nakon formiranja pojedinog somita, njegova površina postane epitelna. Većina unutarnjih stanica razvit će se u miotom. Prve stanice koje se produžuju su mišićna vlakna iz središnjeg somatskog epitela. Drugi derivat somita je sklerotom, a posljednji derivat je dermatom. U ovom stadiju endodermalne stanice postaju prepoznatljivije i lakše za identifikaciju. Endoderm se može razviti samo na dorzalnoj strani embrija, ispod aksijalnog i paraksijalnog mezoderma (Kimmel i sur.,1995). Kod ektodermalnih struktura tijekom gastrulacije, neuralna ploča postane jako dobro vidljiva. Neuralna cijev se razvija procesom sekundarne gastrulacije (Papan i sur.,1994). Kod ribe

zebrice primarna i sekundarna gastrulacija slične su jedna drugoj. Središnji dio neuralne ploče formira ventralne strukture neuralne cijevi, a lateralni dio neuralne ploče formira dorzalne strukture. Neuralni žlijeb formira se procesom savijanja epitela na središnjoj liniji, a zatvaranjem neuralnog žlijeba na središnjoj liniji formira se neuralna cijev. Zbog preklapanja segmentacija i neurulacije *Danio rerio* nema odvojen period neurulacije, kao što susrećemo npr. kod *Xenopusa*. Na početku segmentacije vidljiv je rudiment mozga, a tijekom prve polovice segmentacije pojavljuje se i deset udubljenja uzduž njega, nazvanih neuromere. Prve tri neuromere odgovaraju diencephalonu, telencephalonu i mesocephalonu. Tijekom zadnje faze segmentacije iz ventralnog dijela diencephalona razvija se primordij hipotalamusa, a iz središnjeg dijela epifizni primordij. Preostalih sedam neuomera dijeli stražnji mozak na manje dijelove. Rombomere i ždrijelni lukovi vidljivi su segmenti glave, dok su somiti vidljive komponente trupa i repa (Kimmel i sur., 1995).



Slika 2. Prikaz embrija ribe zebrice tijekom stadija segmentacije. Preuzeto iz https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Main_Page.

2.6 STADIJ FARINGULE

Izraz faringula objedinjuje stanje kada se morfološke značajke embrija svih kralježnjaka najbolje mogu uspoređivati. Kod ribe zebrice to je drugi ili treći dan embrionalnog razvitka. Embrij je tada bilateralno organizirano stvorenje, sa dobro razvijenim notokordom, razvijenim somitima te dugim repom na stražnjem dijelu tijela. Mozak je u tom stadiju podijeljen na pet režnjeva. Stadij je ime dobio po ždrijelnim lukovima, loše razlučivim u ranijem razvoju, koji se tijekom drugog dana embrionalnog razvitka brzo razvijaju. Glava se izdužuje prema dorzalnoj strani. Peraje se počinju oblikovati. Događa se diferencijacija pigmentnih stanica. Melanofori se počinju rearanžirati u karakterističan uzorak za ribu zebricu, horizontalne pruge po tijelu. Dolazi do formiranja krvožilnog sustava i aortalnih

lukova. Također dolazi do razvitka osjetila dodira i sinkronizacije rada miotoma potrebnih za pokrete plivanja (Kimmel i sur., 1995).

2.7 STADIJ IZLEGANJA

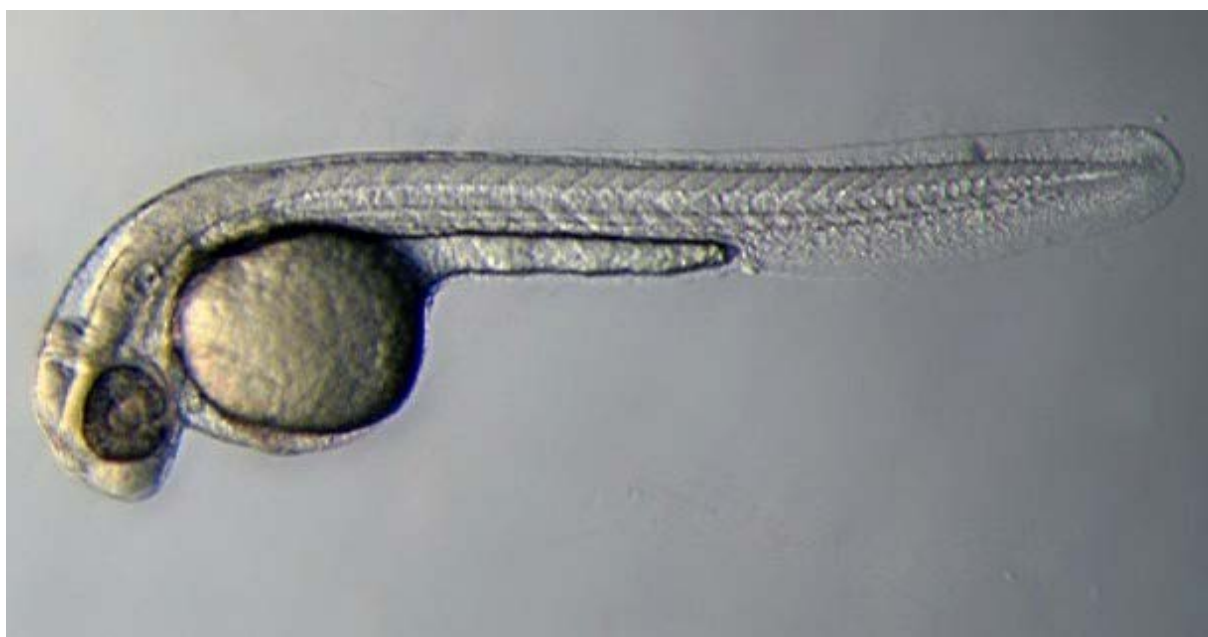
Izleganje se događa nakon tri dana embrionalnog razvitka. Razvojne stadije nazivamo embrijima do 3 dana nakon oplodnje, a nakon toga ličinkama bez obzira jesu li se izlegla ili ne. Tijekom ovog perioda embrij i dalje raste. Morfogeneza većine organa rudimenata je gotova, s izuzećem crijeva i njemu pridruženih organa. Dolazi do brzog razvoja prsnih peraja, čeljusti i škrga. Dolazi do razvitka arterija i vena. Dolazi do drastičnog repozicioniranja usta, koja su dosad bila smještena između očiju, ali se sada premještaju anteriornije i niže. Daljnja morfogeneza usta i čeljusti događat će se i u ranoličinačkom stadiju (Kimmel i sur., 1995).

3. LIČINKA, MLADA I ODRASLA JEDINKA RIBE ZEBRICE

3.1 LIČINKA RIBE ZEBRICE I MLADA JEDINKA

Nakon trećeg dana izlegla ličinka ima gotovo završenu morfogenezu te je duga tri i pol milimetra. Sljedećeg dana dolazi do dolazi do ispunjavanja plivaćeg mjehura zrakom te do ispužanja usta. Također, pruge iridofora posvijetle i zadebljaju. Potom ličinka kreće s aktivnim plivanjem, pomiče očima, čeljusti i prsnom perajom, što omogućava bijeg od predatora, traženje plijena i mogućnost hranjenja (Kimmel i sur.,1995). Taj prijelaz na vanjske izvore hrane od unutrašnjih žumanjčanih rezerva događa se četvrtog dana. Riba zebrica ostaje u ličinačkom stadiju idućih 27 dana, u kojima naraste još sedam milimetara u duljinu. Zbog asinkronog razvoja, stadije ličinke dijelimo prema dužini tijela. Ranu ličinku obilježavaju ispužanje usta anteriorno, vidljiv škrgni nabor, pokretno crijevo i razvijena hrskavica u lukovima. Ranom ličinkom smatra se organizam do dužine četiri i pol milimetra koji ima do osam zubiju. (Slika 3.) Srednjom ličinkom smatra se organizam do osam milimetara dužine te koji ima do deset zubiju. Obilježavaju ga pojava hrskavice u repnom naboru, razvoj prednjih i stražnjih perajnih nabora te okoštavanje ždrijela. Mlade ribe zebrice duge su oko jednog centimetra te imaju deset zubiju. Obilježavaju ih razvoj svih peraja te uspostavljanje pigmentacije kao u odraslog organizma, dolazi do zamjene pronefrona mezonefronom te se uspostavlja nova središnja linija duž tijela, jer se stara pomakla

ventralno. Postoje četiri ličinačke pruge duž tijela crnih pigmentnih stanica, melanocita : dorzalna, ventralna, lateralna i pruga duž žumanjčane vrećice. Tijekom prelaska iz ličinačkog u stadij mladog organizma broj pruga mijenja se u pet. Srebrno-bijele pigmentne stanice, iridofori, koncentrirane su oko očiju i leđne moždine. Riba zebrica ima sposobnost regeneracije kože, peraja, srca i mozga tijekom svojih ličinačkih stadija (Nusslein-Volhard i sur., 2002).



Slika 3. *Danio rerio* tijekom ličinačkom stadija. Preuzeto iz https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Main_Page.

3.2 ODRASLA JEDINKA

Odraslim organizmom smatra se jedinka stara 90 dana od oplodnje. Spada u nadred Ostariophysi, prave koštunjače koje povezuju iste karakteristike kostura. Imaju kosti i ligamente koji povezuju plivaći mjehur s unutarnjim uhom. Kao i sve ribe iz te porodice, porodice Cyprinidae, ima samo jednu dorzalnu peraju i nema masnu peraju. Njezine peraje nemaju bodlje. Tijelo ribe zebrice je izduženo s kratkom glavom i šiljastom njuškom, ispod koje su nakrivljena, podignuta usta. Kao i kod drugih vrsta ove porodice, parna prsna i neparna dorzalna peraja postavljene su posteriorno, kako bi omogućile ubrzanje. Generacijsko vrijeme ribe zebrice je tri mjeseca. Kako bi došlo do mriještenja mužjak mora biti prisutan. Ženke mrijeste u intervalima od 2 do 3 dana po nekoliko stotina jajašaca. Nakon oplodnje

slijedi embrionalni razvoj, ličinački razvoj i razvoj u odraslu jedniku (Nusslein-Volhard i sur., 2002).



Slika 4. Odrasli organizam ribe zebrice, na kojem su vidljive specifične, horizontalne pruge plave boje duž cijelog tijela. Preuzeto iz <http://zf-health.org/>.

4. PREDNOSTI RIBE ZEBRICE KAO MODELNOG ORGANIZMA

Posljednjeg desetljeća *Danio rerio* koristi se kao modelni organizam kralježnjaka, najviše u genetičkim istraživanjima embrionalnog razvoja. Glavne prednosti su jednostavnost održavanja i parenja. Embriji su dovoljno jaki da se s njima može manipulirati, npr. mikroinjekcijom i eksperimentima transplantacije stanica. Vrijeme razvoja embrija je kratko, što omogućava i eksperimentima da traju kratko, od nekoliko sati do nekoliko dana. Transparentnost embrionalnog koriona i ličinačkih stadija omogućuje jednostavnu vizualizaciju unutarnjih procesa, poput stvaranja i funkcije unutarnjih organa neke životinje. To također olakšava praćenje ekspresije fluorescentno obilježenih transgena i mjerenje genske aktivnosti. Riba zebrica ima velik broj mladih, u odnosu na druge modelne organizme. U idealnim uvjetima, ženka može omrijestiti i do 200 jajašaca. Ako se križa u laboratorijskim uvjetima, zebrica mrijesti tokom cijele godine. Konstatnost dostupnosti mladih ribe zebrice, dobivenih iz definiranih roditelja, idealna je za istraživanje novih gena i njihove funkcije u kralježnjaka. Te prednosti, u kombinaciji s nedavno uspostavljenim protokolima i alatima za genetsku manipulaciju i analizu, čine *Danio rerio* osobito prikladnim za otkrivanje mehanizama genetičke regulacije, na kojima počiva razvoj i funkcija kralježnjaka (Carpio i sur., 2006).

5. METODE KOJE SE KORISTE U ISTRAŽIVANJIMA

Prije 25 godina riba zebica prvi put je predložena kao modelni organizam. Od tada do danas, broj alata i tehnika koje se koriste za saznanja o embrionalnom razvoju je drastično porastao. Jedni od prvih uspostavljenih protokola bili su protokoli za uspješnu mutagenezu. Došlo je do karakterizacije nekoliko stotina mutacija. U posljednje vrijeme sve češće su tehnike reverzne genetike (Carpio i sur.,2006).

5.1 GENETIKA

Genetičko pretraživanje i dalje je najčešća metoda za identifikaciju gena s osnovnim funkcijama. Bazirano je na nasumičnom induciranju mutacije te pretraživanju jedinki s mutantnim fenotipom. Prednost genetičkog pretraživanja u odnosu na metode reverzne genetike je nepristranost prema dosadašnjim saznanjima i mogućnost otkrivanja novih gena. Međutim, sposobnost da se identificiraju mutanti za određene morfološke strukture, procese ili ponašanja traži stvaranje posebnih testova, koji omogućuju otkrivanje određenih fenotipova. Također ove metode imaju mogućnost otkrivanja gena samo s jedinstvenim i ili barem djelomično neredundantnim funkcijama, dok će oni s redundantnim proći neotkriveno. Uspostavljeno je nekoliko mutagenetskih protokola, poput protokola za kemijsku mutagenezu, radijaciju, ψ -zračenje, mutagenezu koristeći retrovire ili transpozone... (Carpio i sur.,2006).

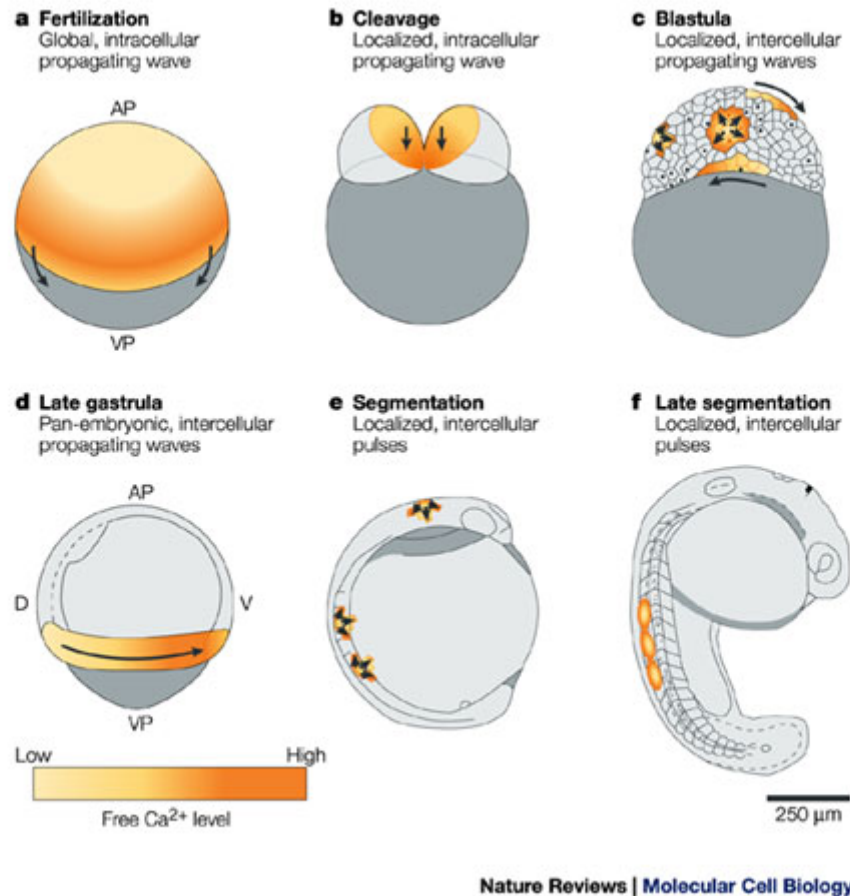
5.2 REVERZNA GENETIKA

Sekvencioniranjem genoma utvrđeno je mnogo novih gena čije se funkcije još ne znaju. Također postoji i puno gena čije su funkcije samo djelomično karakterizirane. Pristupi reverzne genetike, *knock-out* i *knock-down* traženih gena, omogućuju brzo objašnjenje funkcije poznatih i nekih predviđenih gena. Otkriveno je da dvolančana RNA molekula može biti moćan i specifičan inhibitor genske aktivnosti ribe zebice. To se naziva interferencija RNA i događa se na posttranslacijskom nivou, gdje dolazi do degradacije endogene mRNA. Otkriveno je da se 80% embrija, u koje je unesena dvolančana RNA, razvija defektno. Pokazano je da dvolančana injektirana RNA ima višestruke učinke u embriju zebice, ali ti učinci ovise o prirodi i lokaciji dupleksa. Morfolino upravljani *knock-down* pokazali su se

vrlo uspješni u zebrici. Morfolino je oligomer, duljine 18-25 pb čija je okosnica kemijski modificirana, čineći oligomer otpornim na endonukleaze. Morfolino upravljajući *knock-down* putem specifičnog vezanja morfolino oligomera i mRNA veže se za mRNA te je degradira. Najčešće se veže za START kodon, AUG te tako dolazi do prekida translacije mRNA produkata. Konačan rezultat je mutant, fenotipa sličnog fenotipu mutanta s potpunim gubitkom funkcije. Ovaj pristup posebno je dobar za otkrivanje fenotipova neokarakteriziranih gena ili za testiranje gena kandidata za mutante identificirane mutagenезom. Nedostatci ovog pristupa su to što se fenotipovi mogu pouzdano identificirati prva tri do četiri dana razvitka pa se morfolino može vezati na mRNA nespecifično, ukoliko je sekvenca slična genu od interesa te se ovakav *knock-down* oblik ne prenosi na potomke, već je samo privremen. Svi ovi nedostatci koje posjeduje morfolino pristup, ne postoje u TILLING metodi. To je tehnika izolacije mutanata s definiranim mutacijama. Bazira se na nasumičnom stvaranju mutacije putem kemijske mutageneze i naknadnom pretraživanju mutacija u željenim genima. Transgeneza je metoda koja proučava funkcije gena *in vivo* te stvaranje jedinki s novim karakteristikama. Razvijene su tehnike za postizanje ili prijelazne ili stabilne ekspresije transgena. Prijelazno eksprimirani geni često ne prate endogeni uzorak ekspresije gena. Razvijeno je nekoliko metoda za kreiranje stabilnih transgenetskih linija. Neke od njih su infekcija s retrovirusnim vektorima, elektroporacija i mikroinjekcija plazmidne DNA (Carpio i sur.,2006).

5.3 METODE STANIČNE BIOLOGIJE

Kako je zebrica postala omiljeni modelni organizam kralježnjaka, tako se razvija i sve veći broj metoda stanične biologije. Jedna od takvih metoda je obilježavanje stanica bojom, koje se radi ili mikroinjekcijom pod velikim tlakom ili pod velikim naponom nakon 256-staničnog stadija. Problem je bio što su stanice nakon petog ciklusa diobe povezane citoplazmatskim mostićem, pa je razvijena tehnika bojanja dekstranom, jer dekstran može proći kroz te mostiće. Nakon bojanja, stanice se obasjaju laserom te dolazi to oslobađanja boje. Transplatacija stanica također je česta metoda. Transplatacija između divljeg tipa i mutanta koristi se za uspostavljanje stanične autonomije mutantnog fenotipa (Carpio i sur.,2006). (Slika 5.)

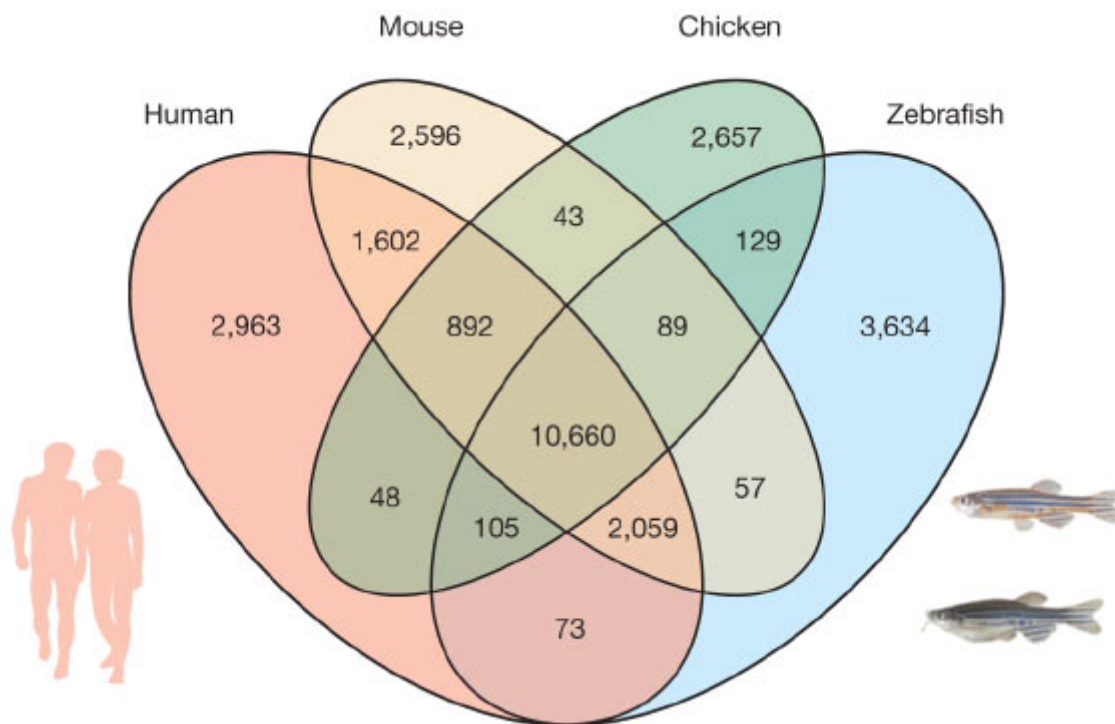


Slika 5. Distribucija iona kalcija tijekom različitih stadija embrionalnog razvoja ribe zebrice, kao jedan od eksperimentalnih parametara u metodama stanične biologije. Preuzeto iz <http://www.nature.com/nrm/index.html>.

5.4 GENOMIKA

Proizvedeni su mikročipovi *Danio rerio*, koji sadrže ili fragmente DNA iz označenih eksprimiranih sekvenci i „knjižnica“ cDNA ili iz oligonukleotidnih „knjižnica“, baziranih na svim genima ili transkripcijskim jedinicama pretpostavljenih iz bioinformatičkih analiza cijelog genoma ribe zebrice. Nekoliko genetskih mapa je konstruirano za ovu ribu. Inicijalna mapa je konstruirana iz 705 mikrosatelitnih markera, gdje je mapirano ukupno 3,845 mikrosatelita. Kako bi se pojednostavilo pozicijsko kloniranje mutacija, napravljeno je nekoliko „knjižnica“ bakterijskih artifičnih kromosoma. 2001. Godine Sangerov institut inicirao je sekvencioniranje cijelog genoma (Carpio i sur.,2006). Nakon sekvencioniranja cijelog genoma zebrice, napravljeno je preklapanje genoma zebrice i ljudskog genoma te je

utvrđeno da čak 70% gena ljudskog genoma posjeduje barem jedan ortologni gen u genomu ribe zebrice. Taj podatak potvrđuje njezinu kvalitetu kao modelnog organizma u istraživanjima razvoja kralježnjaka (Howe i sur.,2013) (Slika 6.)



Slika 6. Shema broja gena koji se podudaraju između čovjeka, miša, kokoši i zebrice. Preuzeto iz <http://www.sci-news.com/>.

6. PRIMJERI ISTRAŽIVANJA S RIBOM ZEBRICOM KAO MODELNIM ORGANIZMOM RAZVOJNE BIOLOGIJE

1. Identifikacija ciljnih gena učinka estrogena putem analize transkripta tijekom razvojnih stadija embrija i ličinke ribe zebrice. Signalizacija estrogenom bitna je embrionalni razvoj svih kralježnjaka. U ovom radu *Danio rerio* se koristi kao modelni organizam za analizu ove signalizacije. Embriji ribe zebrice bili su izloženi 17 β -estradiolu tri do četiri sata nakon oplodnje te se potom radila ekstrakcija RNA kako bi se transkripti analizirali (Hao i sur., 2013).
2. Utjecaj nitrita na razvoj embrija i ranih ličinačkih stadija ribe zebrice. Epidemiološka istraživanja pokazala su da visoke koncentracije nitrita u hrani i vodi mogu uzrokovati probleme pri rođenju i spontane pobačaje kod ljudi. U ovom radu riba zebrica

korištena je kao modelni organizam i njezini embriji bili su izloženi etanolu, nitritima i nitratima u trajanju od 24 do 96 sati, dok su ličinke bile izložene istim spojevima 120 sati (Simmons i sur., 2012).

3. Prednosti u istraživanju razvoja srca i srčanih bolesti koristeći ribu zebricu. Urođene srčane bolesti najčešći su oblik bolesti koji se javlja tijekom rođenja djeteta, a javljaju se tijekom razvoja i sazrijevanja srca. U ovom radu *Danio rerio* je korišten kao modelni organizam nudeći neke prednosti u odnosu na tradicionalne modelne sisavce. Neke od njih su brzi, stereotipni razvoj velikog broja embrija od uzgojenih odraslih riba zebrica (Brown i sur., 2016).

7. ZAKLJUČCI

Riba zebrica postala je popularan modelni organizam zahvaljujući brojnim karakteristikama poput visoke plodnosti, male veličine, brzog razvoja, kratkog generacijskog vremena... Velik potencijal ima u embriologiji zbog dobre optičke vidljivosti embrija i ličinke te također u neruobiologiji, pri istraživanju bolesti mozga, radi velike sličnosti živčanog sustava ribice i čovjeka. Svrha korištenja životinjskih modela je bolje razumijevanje nastajanja i tijeka raznih bolesti, bez stvaranja rizika za čovjeka. Iako se u posljednje vrijeme često koriste kulture stanica *in vitro*, rezultati ne budu uvijek usporedivi s rezultatima testova *in vivo*. Stoga, potreba za životinjskim modelima još postoji. Istraživanja su skupa, vrijeme provedbe eksperimenta je dugo, pogotovo kod sisavaca pa se koristi noviji modeli, ribe i beskralježnjaci. Iako se pokazala kao izvrstan model u biomedicinskim istraživanjima, još je mnogo nepoznatog o ovoj ribi. U budućnosti, potrebno je uložiti više truda u otkrivanje nepoznatog, kako bi te nove informacije pomogle u svrhu još boljeg razumijevanja biomedicinskih istraživanja.

8. LITERATURA

Brown DR, Samsa LA, Qian L, Liu J, 2016. Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish. J Cardiovasc Dev Dis. 2016 Jun; 3(2): 13.
doi: 10.3390/jcdd3020013.

Carpio Y, Estrada MP, 2006. Zebrafish as a Genetic Model organism. Aquatic Biotechnology Project. Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Havana, Cuba. Biotechnologia Aplicada 2006;23:265-270.

Gerhard GS, Kauffman EJ, Wang X, Stewart R, Moore JL, Kasales, C J, Demidenko E, Cheng KC, 2002. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). Exp Gerontol. 2002 Aug-Sep;37(8-9):1055-68. PMID: 12213556.

Gilbert FS, 2000. Developmental biology, 6th edition. Swarthmore College. Sunderland (MA): Sinauer Associates. ISBN-10: 0-87893-243-7. p300-303.

Hao R, Bondesson M, Singh AV, Riu A, McCollum CW, Knudsen BT, Gorelick DA, Gustafsson J, 2013. Identification of Estrogen Target Genes during Zebrafish Embryonic Development through Transcriptomic Analysis. PLoS One. 2013; 8(11): e79020. doi: 10.1371/journal.pone.0079020.

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE, 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol Sci. 2005 Jul;86(1):6-19. PMID 15703261
doi: 10.1093/toxsci/kfi110.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature. 2013 Apr 25; 496(7446): 498–503.
doi: 10.1038/nature12111.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF, 1995. Developmental Dynamics 203: 255-310. Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403-1254 (Department of Biology, Dartmouth College, Hanover, NH 03755. p260-303. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.

Li HH, Huang P, Dong W, Zhu ZY, Liu D, 2013. A brief history of zebrafish research- toward biomedicine. Yi Chuan. 2013 Apr;35(4):410-20. PMID 23659931.

Nusslein-Volhard C, and Dahm R, 2002. Zebrafish: a practical approach. New York: Oxford University Press. 303p, 59-65.

Papan C, Campos-Ortega JA, 1994. On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. ArchDevBiol. 203: 178. doi:10.1007/BF00636333.

Simmons A, Karimi I, Talwar M, Simmons TW, 2012. Effects of Nitrite on Development of Embryos and Early Larval Stages of the Zebrafish (*Danio rerio*). Zebrafish. 2012 Dec; 9(4): 200–206. doi: 10.1089/zeb.2012.0746.

Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F, 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291(5813): 293-296 (Journal). PubMed 7248006. doi:10.1038/291293a0.

Watts SA, Powell M, D'Abramo LR. 2014. Fundamental Approaches to the Study of Zebrafish Nutrition. *ILAR J.* 2012; 53(2): 144–160. doi:10.1093/ilar.53.2.144.

Developmental Biology Interactive, <http://www.devbio.biology.gatech.edu/>.

Zebrafish Development,
https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Main_Page.

Encyclopedia of life, <http://eol.org/>.

FishBase, <http://www.fishbase.org/search.php>.

Nature Reviews Molecular Cell Biology, <http://www.nature.com/nrm/index.html>.

Sci news, <http://www.sci-news.com/>.

USGS science for a changing world, <https://www.usgs.gov/>.

ZF- HEALTH- Zebrafish Regulomics for Human Health, <http://zf-health.org/>.

9. SAŽETAK

Danio rerio, zebrica, riba je iz porodice Cyprinidae, duljine do pet, a širine do dva i pol centimetra. Porijeklo vuče iz Indije, a može je se pronaći i u plitkim vodama i barama Nepala, Bangladeša i Pakistana. Duž tijela nalaze se horizontalne pruge plave boje. Ženke su veće od mužjaka. Embrionalni razvoj ribe zebrice traje 72 sata nakon oplodnje, tijekom kojega embrij prolazi kroz sedam razvojnih stadija: zigota, stadij dioba, blastula, gastrula, segmentacija, faringula i izleganje. Nakon izleganja slijedi ličinački stadij u trajanju od 27 dana, nakon kojega se ličinka razvija prvo u mladu, potom u odraslu jedinku. Potpuno odraslim organizmom smatra se jedinka stara 90 dana od oplodnje. *Danio rerio* koristi se kao modelni organizam kralježnjaka, najviše u genetičkim istraživanjima embrionalnog razvoja. Neke od prednosti ribe zebrice kao modelnog organizma su jednostavnost uzgoja, mogućnost manipulacije parenjem i embrijima. Također, kratko vrijeme razvoja embrija te njihova velika dostupnost, zbog činjenice da ženke mogu omrijetiti i 200 jajašaca odjednom, omogućuju eksperimentima da traju kratko. Visoka transparentnost embrionalnih i ličinačkih stadija olakšava identifikaciju i vizualizaciju. Osim u razvojnoj biologiji, zebrica se kao modelni organizam koristi i u genetici, neurobiologiji, onkologiji, evolucijskoj biologiji... U posljednje vrijeme napravljeni su protokoli i alati za genetsku manipulaciju i analizu, čime *Danio rerio* postaje osobito prikladan za istraživanje regulacije gena, a time i samog tijeka razvitka i funkcije svih kralježnjaka.

10. SUMMARY

Danio rerio, zebrafish, is a fish from the family Cyprinidae, up to 5 cm long and 2,5 cm wide. Originating from India, it is also commonly found in the shallow waters and ponds of Nepal, Bangladesh and Pakistan. Blue horizontal stripes extend along the body. Female zebrafish are bigger than the male. Embryonic development of the zebrafish lasts up to 72 hours after the fertilization, during which the embryo goes through seven stages of development: zygote, cleavage stage, blastula, gastrula, segmentation, pharyngula and hatching. After the hatching follows larval stadium in the duration of 27 days, after which the larva firstly develops into a juvenil and then into an adult organism. Organism old 90 days after the fertilization is considered to be fully matured. *Danio rerio* is used as a vertebrate model organism, mostly in the genetic research of the embryonic development. Some of the advantages of a zebrafish serving as a model organism are the simplicity of cultivation, and the possibilty of manipulation with breeding and embryos. Also, the short duration of embryo development and their great accessability, due to the fact that female zebrafish can spawn up to 200 eggs at once, enable the short duration of experiments. High transparency of the embryoid and larval stages simplifies the identification and the visualisation. Besides in the developmental biology, zebrafish is also used as a model organism in genetics, neurobiology, oncolgy, evolutionary biology... Lately protocols and tools for the genetic manipulation have been made, which makes *Danio rerio* especially suitable for the research of the gene regulation, and thus also of the development process and the function of all vertebrates.

.